

各種薬剤の虚血性細胞障害に対する保護効果，海馬切片を用いた検討

著者	天笠 雅春
号	2055
発行年	1989
URL	http://hdl.handle.net/10097/20256

氏 名（本籍）あまがさまさはる
天 笠 雅 春

学 位 の 種 類医学博士

学 位 記 番 号医第2055号

学位授与年月日平成元年2月22日

学位授与の要件学位規則第5条第2項該当

最 終 学 歴昭和57年3月
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目各種薬剤の虚血性細胞障害に対する保護効果，海
馬切片を用いた検討

（主 査）

論 文 審 査 委 員教授吉本高志教授小暮久也

教 授 岩 崎 祐 三

論文内容要旨

目 的

我々はこれまでに *in vivo* の実験で各種脳保護物質 マンニトール, ビタミンE, フェニトイン, ステロイドの有用性を報告してきたがこれらの薬剤の虚血下のニューロンに対する効果を海馬切片を用いて *in vitro* で電気生理学的及び組織学的に検討した。

実 験 方 法

モルモットを無麻酔下に断頭して海馬を迅速に取り出して厚さ400 μ の海馬切片を作製し95% O₂ 5% CO₂ で飽和したKrebs-Ringer液に浸した。切片をこの標準液に2時間以上浸しておいた後実験用chamber内の観察槽に移し実体顕微鏡下に観察しながらガラス微小電極をマイクロマンニプレータで歯状回の顆粒細胞層に刺入し苔状線維を電気刺激してシナプスを介さない antidromic な場の電位 field potential (FP) を記録した。FPの振幅が安定し30分以上経過した所で、標準液よりD-グルコースを除き95% N₂ 5% CO₂ で飽和した無酸素無グルコース液を約10ml/minで10分間灌流し無酸素無グルコース状態(以下“虚血”と呼ぶ)を負荷した。虚血10分後再び酸素で飽和した標準液を灌流して脳切片の“再開通”を行った。以上の経過中のFPの振幅の変化を記録した。以上の実験系をコントロール群とし各種薬剤(マンニトール, ビタミンE, フェニトイン, デキサメサゾン)を虚血前30分間及び虚血中にメディウム中に混和しておき再開通60分後までのFPの回復を観察した。再開通後60分の切片をホルマリン固定し海馬切片の光顕的観察をおこない組織学的にも薬剤効果を検討した。標本は切片の面に対して平行に連続切片を作製しヘマトキシリン・エオジン染色を行なった。

結 果

標準液からグルコースを除きかわりに何も加えないメディウムによる虚血ではFPは4-6分で消失したが再開通後1時間でFPは虚血前の $5 \pm 1\%$ (平均 \pm S. E. M., $n=14$) に回復した。またグルコースのかわりにマンニトール10mMを加えたメディウムによる虚血ではやはりFPは4-6分で消失し再開通60分後の回復は $6 \pm 2\%$ ($n=8$) であり両者に有意差を認めなかった。さらに虚血前, 虚血中にマンニトール1 mM 10mMを加えた場合でもFPの回復には有意の差を認めなかった。次に虚血中にマンニトール10mM含み浸透圧を310mOsmに維持した条件下で, 各種薬剤を虚血前30分間及び虚血中に灌流液に加えその効果を検討した。フェニトイン25 μ Mを加えた場合にはFPの消失は7-9分に延長し, 75 μ Mを加えた場合には9-10分と

なった。60分後のFPの回復はフェニトイン25 μ M, 75 μ M投与では $30 \pm 9\%$ ($n=7$), $86 \pm 8\%$ ($n=8$) でありアレピアチン対照液では $2 \pm 1\%$ ($n=8$) であった。ビタミンEは100 μ M, 230 μ M, 700 μ Mで検討したがFPの消失は7-9分であり再開後60分の回復は $19 \pm 5\%$ ($n=4$), $45 \pm 7\%$ ($n=8$), $50 \pm 4\%$ ($n=4$) であった。さらにデキサメサゾン2 μ M, 10 μ MではFPの消失は5-8分であり再開後60分の回復は $32 \pm 9\%$ ($n=6$), $25 \pm 7\%$ ($n=12$) であった。さらにフェニトイン25 μ MとビタミンE230 μ Mを併用するとFPの消失は8-9分であり再開後60分のFPの回復は $75 \pm 6\%$ ($n=8$) となった。フェニトイン25 μ M, ビタミンE230 μ M, デキサメサゾン2 μ Mの併用ではFPは10分では消失せず $35 \pm 10\%$ となり再開後60分の回復は $89 \pm 5\%$ ($n=12$) であり有意の相加効果を認めた。海馬切片の歯状回のニューロンは標準液の中で光顕的に断頭後12時間まで形態上著明な変化を認めなかった。脳切片ではニューロンが障害されると細胞は著明に膨化し核はpyknoticになる。障害細胞の出現の程度により70%以上の障害をsevere, 30%以下の障害をmild, その中間をmoderateと3段階に分けて一枚の切片上でそれぞれの割合を計測した。まずマンニトールを虚血中に含まないものと含むものを比較すると両者に差を認めずいずれも著明に障害されていた。以下マンニトールを虚血中に含むものをコントロールとして各種の薬剤を含むものを比較するといずれもsevereな障害は有意に低下しmildの障害は有意に増加していた。そしてその程度はFPの回復と良く相関し, FPの回復がよいものほど細胞障害は軽微であった。特にフェニトイン75 μ M投与群ではmildの障害が $40 \pm 28\%$ (平均 \pm S. D., $n=8$), フェニトイン25 μ M, ビタミンE230 μ M, デキサメサゾン2 μ Mの併用群ではmildの障害が $67 \pm 20\%$ ($n=9$) と著明に細胞が保存されていた。

結 論

海馬切片の歯状回細胞層に対するantidromicな場の電位は無酸素無グルコースを虚血のモデルとして用いた場合にこの細胞層の障害を示す有用な指標と考えられた。このモデルを用いて以下の事実を明らかにした。実験事実が電気現象の消失と回復の延長と組織学上の対応でありここに行なった限定された条件下ではあるが、このことからつぎのように結論した。①フェニトイン, ビタミンEは海馬切片上で歯状回ニューロンの無酸素無グルコースに対して保護効果を示す。②フェニトイン25 μ M投与群およびそれらの併用群でその効果は著明である。③マンニトールはこの実験モデルにおいては有効性を認めない。

審 査 結 果 の 要 旨

従来われわれの教室では脳動脈瘤手術及び脳梗塞の治療をめざして様々な脳保護物質の研究を行っているが、in vivoの実験が示しているとおりに本当にそれらの薬剤が脳細胞を保護しているのかはこれまでの実験では充分明らかではなかった。そこでこの論文では神経細胞に対して直接の効果を検討するために近年神経化学の分野で一般的に用いられるようになった脳切片を使ってこれまでとはことなつた形で細胞レベルで再検討を行ったものである。

脳切片を脳の虚血や低酸素のモデルとして用いることはつい最近になって行われ始めたが、脳梗塞のモデルというよりも低酸素のsynaptic transmissionに対する影響ということで行われている。脳梗塞のモデルとして低酸素、低グルコースを用いてしかも細胞の生死の指標としてantidromicな場の電位を用いている報告はこれが初めてのものである。しかも形態変化をあわせて検討している報告は他にないことから、本法は脳切片を脳梗塞のモデルとして用いる場合の一つの有用な方法と考えられる。

この方法によってin vivoのデータで有効と考えられた薬剤マンニトール、ビタミンE、フェニトインのうちフェニトイン、ビタミンEに脳細胞保護効果を認めたがマンニトールは効果を認めなかったとしている。このことは我々の教室で行っているin vivoの実験結果と一部異なるものであり、これまで考えてきたメカニズムを改めて考え直すべきデータとなっている。これらの結果は、今後更に検討を続けなければならないが、ここに示された事実は明快であり、この実験内容は博士論文に値するものと思われる。